3. 1 アッセイの概要

*Telo*TAGGG Telomerase Length Assayを用いて培養細胞や組織試料中のテロメラーゼの長さを決定するノンラジオアクティブな方法は，以下の実験ステージにより行われます．

ステージ	操作の説明[1]	所要時間
A	● DNA Isolation Kit for Cells and Tissueを用い，細胞培養または組織からジェノミックDNAを分離します．	約 2.5時間
B	● 分離されたDNA溶液を卓上遠心機で手短に遠心します． ● DNAを切断する頻度が高くテロメアの反復配列は切断しない制限酵素 2 種類[2]により，分離されたジェノミックDNAを消化させます．	5 分間 2 時間
C	● アガロースゲルで制限酵素消化による産物（低分子フラグメントおよび消化されなかったテロメラーゼの反復配列）を分離します．	2 ～ 4時間
D	● ゲル中でDNAを脱プリン化します． ● ゲル中でDNAを変性させます． ● ゲルを中和します． ● サザンブロット（キャピラリートランスファー法）により分離したDNAフラグメントをポジティブチャージのナイロンメンブレンへトランスファーします． ● UVクロスリンキングまたはベーキングにより，DNAをメンブレンに固定します．	5 ～10分間 15分間×2回 15分間×2回 6 ～16時間 10～20分間
E	● DIG Easy Hyb[2] を用い， ブロットとプレハイブリダイズさせます． ● 末端制限酵素フラグメント（TRFs）を認識するDIGラベルされたプローブ[2] を用い，ブロットとハイブリダイズさせます．	30～60分間 3 時間
F	● アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体[2] およびCDP-*Star* 化学発光アルカリホスファターゼ基質を用い，プローブとTRFとのハイブリッドを検出します． ● X-線フィルムまたはイメージャーを用いて化学発光のシグナルを記録します．	約 2.5時間
G	● イメージャーを用いて，TRFs平均長を計算します． ***ノート：***TRFの長さを計算するには，ゲル上での各テロメアフラグメントの完全な長さと，そのフラグメントが発する化学発光シグナルの強度を決定する必要があります．これらのパラメーターを合計し一般化することにより， 平均的なTRFの長さが得られます．イメージャー上で，これらの計算のために特にデザインされたソフトウェアのマクロを使用することにより，値の決定を最も簡単に行うことが可能です．	約30分間

1 テロメアレングスアッセイを行う方法の詳細については，*Telo*TAGGG Telomerase Length Assay, Cat. No. 2 209 136の取扱説明書を参照ください．
取扱説明書は， 弊社のウェブサイト（http：/www.roche-applied-science.com）でもご覧いただけます．
2 試薬は*Telo*TAGGG Telomerase Length Assayの内容物として含まれています．